

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 22 日現在

機関番号：24403

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25450449

研究課題名(和文) 抗原タンパク表層ディスプレイ型大腸菌によるサルモネラ多価不活化経口ワクチンの開発

研究課題名(英文) Development of oral inactivated multivalent Salmonella vaccine using E. coli cell surface display system

研究代表者

谷 浩行 (Tani, Hiroyuki)

大阪府立大学・生命環境科学研究科・准教授

研究者番号：00305658

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：大腸菌表層ディスプレイシステムを利用して、アジュバントとしてコレラ毒素Bサブユニット(CTB)、あるいはETECの易熱性毒素Bサブユニット(LTB)と抗原としてSalmonella Enteritidis(SE)のfliCタンパク質を大腸菌菌体表層に共発現後、不活化し、鶏に種々の経路で投与したところ、SE鞭毛タンパク質に対する血中IgG抗体価および腸粘液中IgA抗体量が増加した。LTBとfliCタンパク質を共発現した不活化菌の点眼により免疫した鶏にSEを接種したところ、盲腸内容物中のSEの検出数が有意に減少した。本研究成果は、サルモネラに対する粘膜ワクチンの開発に応用できる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In order to develop oral inactivated multivalent Salmonella vaccine, the fusion proteins of cholera toxin B subunit (CTB) or heat-labile enterotoxin B subunit (LTB) of ETEC, which are the suitable candidates for mucosal adjuvant, and fliC as Salmonella Enteritidis (SE) vaccine candidate protein were expressed on the surface of E. coli by using E. coli surface display system. The chickens were immunized by oral, intra-muscular or intra-ocular route with the inactivated E. coli expressed fusion proteins. SE flagellar specific serum IgG titer and intestinal mucous IgA concentration were increased after immunization. The immunized chickens with intra-ocular administration of inactivated E. coli expressed LTB and fliC fusion protein showed significantly decreased bacterial counts in the cecal contents. Our findings obtained in this study can be applied to development of simple and safety mucosal Salmonella vaccine.

研究分野：獣医学

キーワード：サルモネラ 不活化ワクチン 大腸菌表層ディスプレイ

## 1. 研究開始当初の背景

我が国の食糧自給率は低下の一途を辿り、特に畜産物に著しい中、鶏肉、鶏卵は未だ生産額ベースで他の畜産物を上回る。しかし、飼料自給率を考慮すると、同様に低値を示すことから、尚一層の生産効率の向上が必要不可欠である。一方、食の安全に対する国民の意識がなお高まりつつある中、サルモネラ属菌を原因とする食中毒は、日本国内において未だ数多くの患者数が報告されている。国内発生事例の多くを占める *Salmonella* Enteritidis(SE)や *S. Typhimurium* (ST) は主に鶏肉、鶏卵、およびその加工品を介して感染することから、鶏舎、加工施設などの衛生環境の向上が重要とされているが、サルモネラ属菌の伝搬経路はきわめて多様であり完全な防除が難しいことから、ワクチン接種の併用による鶏のサルモネラ汚染防除が推奨されている。現在、日本で認可されている不活化ワクチンは、海外で用いられている弱毒化生ワクチンに比べ、ワクチン株の強毒化などの問題は無いものの、効果が弱く、さらに注射による経皮投与では、細菌の感染防除に重要な粘膜系免疫システムの誘導には効果が低い。鶏は生後 2~3 週間以上経過すると SE を保有していても症状を示さないキャリアーとなり SE 汚染卵を長期にわたって産出するため、早期に粘膜免疫を増強することにより SE の定着自体を阻止することが重要であると考えられている。

近年、鶏の粘膜系免疫システムの免疫応答の誘導を目的とするワクチンの開発に向けて様々な試みがなされているが、いずれも安全性、コストの面で十分な成果は得られていない。遺伝子組み換え技術により病原性大腸菌の定着因子を非病原性大腸菌の外膜表層にディスプレイさせ、不活化して経口投与することにより粘膜免疫が誘導できることが示されており、SE および ST のワクチン候補抗原タンパク質を表層ディスプレイする非病原性大腸菌を用いた不活化ワクチンの粘膜免疫の誘導に関する研究は、抗原タンパク質の精製・適用に掛かるコストや労力、および生体・環境への影響を最小限とする安全性、コストパフォーマンスの高い経口ワクチンの開発につながる事が期待される。本研究は、より効果的で、利便性の高いサルモネラ多価不活化経口ワクチンを開発し、サルモネラ属菌を原因とする食中毒の制圧を最終目標とする。

## 2. 研究の目的

本研究では、サルモネラ多価不活化経口ワクチンを開発するための基盤技術の確立を目的として、以下の項目について検討を予定していた。

- (1) 大腸菌菌体表層へのサルモネラ多価抗原タンパク質のディスプレイ技術の確立
- (2) 菌体の不活化方法の最適化

- (3) 菌体の粘膜免疫誘導能の評価
- (4) 感染防御効果の評価

## 3. 研究の方法

(1) 大腸菌菌体表層にサルモネラ抗原タンパク質をディスプレイするプラスミドベクターの構築

大腸菌菌体表層にサルモネラ抗原タンパク質を効率的にディスプレイする発現プラスミドベクターを構築するため、pBAD30 プラスミドベクターをベースに、組み換えタンパク質の足場となるアンカータンパク質として、ST の V 型分泌装置のドメインタンパク質(MisL) をコードする遺伝子を ST ゲノム DNA から増幅し、マルチクロニングサイト(MCS)の下流に挿入した。鶏に対して効果が報告されている粘膜アジュバントとして、毒性を持たないコレラ毒素の B サブユニット(CTB)あるいは同様に毒性を持たない毒素原性大腸菌の易熱性毒素 B サブユニット(LTB) をコードする遺伝子を *Vibrio cholerae*、あるいは毒素原性大腸菌ゲノム DNA からそれぞれ増幅し、MCS の上流に挿入した。さらに、既報のサルモネラ抗原タンパク質として、べん毛の構成タンパク質である fliC をコードする遺伝子を SE ゲノム DNA から増幅し、それぞれマルチクロニングサイトに挿入して、CTB あるいは LTB と fliC タンパク質を N 末端に融合発現するプラスミドベクターを作製した。CTB、LTB および fliC タンパク質の大腸菌への発現・機能について免疫蛍光染色、western blotting、および ELISA を用いて検討した。

(2) 菌体表層に組み換えタンパク質を発現した大腸菌の不活化法の検討

菌体表層に発現した組み換えタンパク質に最も影響の少ない大腸菌の不活化法について、既報を参考にホルマリン、加熱、アセトンを用いて大腸菌を不活化し、組み換えタンパク質に対する影響を免疫蛍光染色および ELISA を用いて検討した。

(3) 菌体の粘膜免疫誘導能の評価

CTB と fliC タンパク質を表層にディスプレイした不活化大腸菌を鶏に投与して免疫誘導能の評価に関する予備実験を行った。7 および 21 日齢の交雑種あるいは SPF 鶏に、 $1 \times 10^9$  の 9 乗 cfu の不活化菌体を 2 週間毎に計 3 回経口投与し、2 週間毎に採血、さらに 28~29 日、40~42 日目に小腸粘液、および脾臓組織を採取した。また、14 日齢の交雑種鶏に、同菌数を 2 週間毎に計 2 回点眼投与して 1 週毎に採血、29 日目に小腸粘液および脾臓組織を採取した。

LTB と fliC タンパク質を表層にディスプレイした不活化大腸菌  $1 \times 10^9$  の 9 乗 cfu を 33 日齢の白色レグホン種に、20 日毎に計 2 回点眼あるいは筋肉内投与し、0、20、33 日目に採血、34 日目に小腸粘液および脾臓組織を採

取した。

採取した血清から SE 鞭毛タンパク質に対する IgG 抗体価、および小腸粘液から、IgA 抗体量を評価した。脾臓組織における IFN- $\gamma$ 、IL-4mRNA 発現量を RT-PCR 法を用いて評価した。

#### (4) 感染防御効果の評価

LTB と fliC タンパク質を表層にディスプレイした不活化大腸菌  $1 \times 10^9$  cfu を 33 日齢の白色レグホン種に、20 日毎に計 2 回点眼あるいは筋肉内投与し、34 日目に SE Y-24 Rifampicin 耐性株  $1 \times 10^9$  cfu を経口摂取した。接種後 0、1、4、7、10、および 14 日目に盲腸便を採取すると共に、7 および 14 日目に採血、小腸粘液、肝臓、脾臓および盲腸内容を採取した。

採取した血清から SE 鞭毛タンパク質に対する IgG 抗体価、および小腸粘液から、IgA 抗体量を評価した。盲腸便、肝臓、脾臓および盲腸内容から接種菌の検出を行った。

## 4. 研究成果

### (1) 大腸菌菌体表層にサルモネラ抗原タンパク質をディスプレイするプラスミドベクターの構築

CTB、fliC タンパク質融合発現プラスミドベクターを形質転換した大腸菌を発現誘導したところ免疫蛍光染色では大腸菌表層への CTB タンパク質の発現が認められ、また、western blotting では菌体外膜画分への CTB タンパク質の偏在が認められた。さらに、GM1 ganglioside を抗原とした ELISA では GM1 に対する結合活性が認められた。また、共発現させた fliC タンパク質についても免疫蛍光染色で大腸菌表層への発現が確認され、western blotting においては菌体外膜画分に予想される分子量のバンドが認められた。

LTB、fliC タンパク質融合発現プラスミドベクターにおいても上記と同様の結果が得られた。

### (2) 菌体表層に組み換えタンパク質を発現した大腸菌の不活化法の検討

大腸菌菌体表層に CTB および CTB と fliC タンパク質を共発現した大腸菌を種々の濃度 (0.03 ~ 1.0%)、温度 (4 ~ 37 °C)、時間 (0.5 ~ 48 時間) のホルマリンで不活化したところ、いずれの条件においても、免疫蛍光染色における反応および CTB の GM1 に対する結合性は失われた。同様に 60 ~ 75 °C に加温したところ、温度依存性に CTB の GM1 に対する結合性が減弱し、特に 65 °C 以上では顕著であった。アセトンを用いて不活化を行ったところ、免疫蛍光染色における反応および CTB の GM1 に対する結合性の減弱は認められたものの有意な変化では無かった。

大腸菌菌体表層に LTB および LTB と fliC タンパク質を共発現した大腸菌をアセトンを用いて不活化したところ、免疫蛍光染色における反応および LTB の GM1 に対する結合性

の減弱が認められたものの有意な変化では無かった。

### (3) 菌体の粘膜免疫誘導能の評価

CTB と fliC タンパク質を表層にディスプレイした不活化大腸菌を鶏に経口投与したところ、SE の鞭毛タンパク質に対する血中の IgG 抗体価は、母子免疫の影響と考えられる孵化直後の高値が認められ、一旦低下した後、投与開始後 14 ~ 28 日目からコントロール群と比較して増加傾向が認められた。また、点眼投与群において投与開始後 29 日目にコントロール群と比較して有意な増加が認められた ( $p < 0.05$ )。小腸粘液中の SE 鞭毛タンパク質に対する IgA 抗体量の測定は、既報の方法では非特異的な反応が強く、改良を試みるも詳細な変動を捉えることは出来なかった。脾臓組織における IFN- $\gamma$ 、および IL-4mRNA 発現量については個体差が大きく有意な差は認められなかった。

CTB と fliC タンパク質を表層にディスプレイした不活化大腸菌を用いた粘膜免疫誘導に関する結果から、LTB と fliC タンパク質を表層にディスプレイした不活化大腸菌を点眼あるいは筋肉内投与したところ、SE 鞭毛タンパク質に対する血中の IgG 抗体価は筋肉内投与群において無処置群に比べ有意な増加が認められた ( $p < 0.05$ )。小腸粘液中 IgA 抗体量の測定に関して、反応時に振盪操作を加えることで感度、特異性共に向上させることができたため、本測定法を用いて、SE 鞭毛タンパク質に対する小腸粘液中 IgA 抗体量を測定したところ、各群間で総 IgA 抗体量に差は認められなかったが、SE 鞭毛タンパク質に対する IgA 抗体量は点眼群で増加する傾向が認められた。

### (4) 感染防御効果の評価

SE 接種後の SE 鞭毛タンパク質に対する血中の IgG 抗体価は筋肉内投与群で他の群と比べ有意な増加が認められた ( $p < 0.05$ )。小腸粘液中総 IgA 抗体量は無処置群では SE 接種前と比べ SE 接種後に有意な増加が認められた ( $p < 0.05$ )。点眼群では、SE 接種後 7 日目に有意な増加が見られた ( $p < 0.05$ )。点眼群および筋肉内投与群では 14 日目に減少する傾向が認められた。SE 鞭毛タンパク質に対する小腸粘液中 IgA 抗体量は点眼群および筋肉内投与群において 7 日目に無処置群と比べ高値を示す傾向が認められた。

盲腸便から検出した接種菌の cfu は、全群において経時的に減少し、点眼群においては 4、10 日目にそれぞれ筋肉内投与群および無処置群と比較して有意に減少していた ( $p < 0.05$ )。盲腸内容物における接種菌の cfu は 14 日目に点眼群が筋肉内投与群よりも有意に低値を示した ( $p < 0.05$ )。

以上の研究成果から、本研究で構築した大腸菌菌体表層ディスプレイシステムを用い

て、立体構造を形成するタンパク質を機能性を有して発現させることが可能であった。また、CTB のみならず LTB の様な多量体を形成して機能するタンパク質をも発現させることができた。本研究計画では発現する抗原タンパク質を多価化する予定であったが、複数種の抗原を組み合わせた場合、発現が見られない、あるいは極端に発現量が低くなること明らかになり、研究年度を鑑みて既報のワクチン候補抗原を用いて、鶏への投与実験を優先した。いずれのアジュバント候補を用いた不活化菌体においても投与により抗体価の上昇が認められたが、CTB よりも LTB を点眼投与に用いた場合に、より顕著であったことから、LTB と fliC タンパク質を表層にディスプレイした不活化大腸菌を用いて感染実験を行った。SE 鞭毛タンパク質に対する IgA 抗体量の変化は筋肉内投与群に比べ大きな差は認められなかったものの、盲腸内容物において、SE 接種菌検出数の有意な減少が認められたことから、軽微ではあるが点眼投与による粘膜免疫の惹起、および SE 防除効果が認められたものと考えられる。当初の本研究計画において掲げた経口ワクチンの開発には至らなかったものの、点眼経路を用いて投与日齢、投与機関を最適化することにより、より強い粘膜免疫の誘導が可能であることが期待された。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 8 件)

1. Matsuura Y, Matsubayashi M, Nukata S, Shibahara T, Ayukawa O, Kondo Y, Matsuo T, Uni S, Furuya M, Tani H, Tsuji N, Sasai K, Report of fatal mixed infection with *Cryptosporidium parvum* and *Giardia intestinalis* in neonatal calves., *Acta Parasitol.* 2017 Mar 1;62(1):214-220. 査読有

2. Matsubayashi M, Minoura C, Kimura S, Tani H, Furuya M, Lillehoj HS, Matsuda H, Takenaka S, Hatta T, Tsuji N, Sasai K, Identification of *Eimeria acervulina* conoid antigen using chicken monoclonal antibody., *Parasitol Res.* 2016 Nov;115(11):4123-4128. 査読有

3. Okada S, Furuya M, Takenaka S, Fukui A, Matsubayashi M, Tani H, Sasai K, Localization of heat shock protein 110 in canine mammary gland tumors., *Vet Immunol Immunopathol.* 2015 Oct 15;167(3-4):139-46. 査読有

4. Saeki J, Katsukawa C, Matsubayashi M,

Nakanishi H, Furuya M, Tani H, Sasai K, The detection of toxigenic *Corynebacterium ulcerans* from cats with nasal inflammation in Japan., *Epidemiol Infect.* 2015 Sep;143(12):2660-5. 査読有

5. Furuya M, Funasaki M, Tani H, Sasai K, Identification of novel tumour-associated antigens in canine mammary gland tumour., *Vet Comp Oncol.* 2015 Sep;13(3):194-202. 査読有

6. Sasai H, Fujita D, Tagami Y, Seto E, Denda Y, Hamakita H, Ichihashi T, Okamura K, Furuya M, Tani H, Sasai K, Yamate J., Characteristics of bone fractures and usefulness of micro-computed tomography for fracture detection in rabbits: 210 cases (2007-2013)., *J Am Vet Med Assoc.* 2015 Jun 15;246(12):1339-44. 査読有

7. Matsubayashi M, Teramoto-Kimata I, Uni S, Lillehoj HS, Matsuda H, Furuya M, Tani H, Sasai K, Elongation factor-1 is a novel protein associated with host cell invasion and a potential protective antigen of *Cryptosporidium parvum*., *J Biol Chem.* 2013 Nov 22;288(47):34111-20. 査読有

8. Nagano-Koyashiki S, Matsubayashi M, Kimata I, Furuya M, Tani H, Sasai K, Infectivity of *Cryptosporidium andersoni* Kawatabi type relative to the small number of oocysts in immunodeficient and immunocompetent neonatal and adult mice., *Parasitol Int.* 2013 Apr;62(2):109-11. 査読有

[学会発表](計 1 件)

1. 稲垣果歩、谷 浩行、小西 翔、松林 誠、古家 優、笹井和美  
鶏サルモネラ防除を目指した大腸菌を用いた組換え不活化経口ワクチンの開発  
第 157 回 日本獣医学会学術集会  
2014 年 9 月 11 日 北海道大学

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

谷 浩行 (TANI HIROYUKI)

大阪府立大学・生命環境科学研究科・  
准教授

研究者番号：00305658

(2)研究分担者

笹井和美 (SASAI KAZUMI)

大阪府立大学・生命環境科学研究科・  
教授

研究者番号：70211935

古家 優 (FURUYA MASARU)  
大阪府立大学・生命環境科学研究科・  
助教  
研究者番号：30500706

松林 誠 (MATSUBAYASHI MAKOTO)  
大阪府立大学・生命環境科学研究科・  
准教授  
研究者番号：00321076

(3)連携研究者  
なし

(4)研究協力者  
なし